

JP 06-211683 MACHINE TRANSLATION

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**JAPANESE PUBLISHED PATENT APPLICATION**

(11)Publication number : **06-211683**

(43)Date of publication of application : **02.08.1994**

---

(51)Int.Cl.

**A61K 37/02**

**A61K 37/02**

**// C12P 21/00**

**(C12P 21/00**

**C12R 1:91 )**

---

(21)Application number : **05-246315**

(71)Applicant : **MIKOSHIBA KATSUHIKO**

(22)Date of filing : **06.09.1993**

(72)Inventor : **MIKOSHIBA KATSUHIKO  
IKENAKA KAZUHIRO**

---

(30)Priority

Priority number : **04263031** Priority date : **04.09.1992** Priority country : **JP**

---

**(54) DIFFERENTIATION PROMOTER**

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a differentiation promoter comprising a protein DM-20 having promoting action on the differentiation of an oligodendrocyte.

CONSTITUTION: This differentiation promoter comprises a protein DM-20 which is a genetic product of a gene of myelin proteolipid protein as an active ingredient. The protein DM-20 has a remarkably promoting action on the differentiation of an essentially treating various diseases (diseases of myelin forming disorder, demyelinating diseases, etc.) by differentiating an undifferentiated cell such as in myelin forming disorder in human encephalopathy.

---

## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The differentiation accelerator of the oligo Dendrobium site containing protein DM-20 which are the gene product of a myelin proteolipid protein (myelin proteolipid protein) gene.

[Claim 2] The differentiation accelerator according to claim 1 which is a myelinogenesis failure nature disease therapy agent or a demyelinating disease therapy agent.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the differentiation accelerator of an oligo Dendrobium site (oligodendroglia). More, protein DM-20 which are the gene product of a myelin proteolipid protein (it is called PLP myelin proteolipid protein and the following) gene are made into an active principle at a detail, and it is related with a differentiation accelerator useful for the therapy of a myelinogenesis failure nature disease, a demyelinating disease, etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] Myelin is film which has rolled and wrapped the surroundings of the axon axon which is the projection of a nerve cell, and is formed by oligodendroglia (oligodendrocyte) and the peripheral nervous system by the central nervous system from the film with which the projection of a Schwann cell (schwann cell) specialized. a nervous system -- it is known that an existence-inside part is white matter in a central nervous system, and mainly a medullated nerve fiber in the peripheral nervous system. The role of the saltatory conduction which the node of Ranvier which is the outcrop of an axon is excited, and conducts a stimulus is well known at the same time it generally prevents the leak of the electric nerve conduction between cells by covering the projection of a nerve cell as the role. Moreover, the process in which the above-mentioned myelin takes and rolls the surroundings of an axon is called myelinogenesis process, a formation rate is already with the kind of an animal, stages differ, and the great portion of myelinogenesis will already be ended by the end time of 2 years old in \*\* in Homo sapiens at a perinatal period.

[0003] Myelin basic protein (myelin BASIC protein:MBP) and myelin proteolipid protein (PLP) are one of those which are known as main configuration protein of central nervous system myelin, it aligns at a myelinogenesis term, and a manifestation prospers. Localization of the MBP is carried out between intimae, and it is considered to paste up the insides of a cell membrane. Moreover, PLP penetrates the film from the hydrophobicity of the amino acid composition, enters into the lipid duplex film with which the part [ further ] adjoined, pastes up adventitious, and is considered to participate in stabilization of myelin membrane including formation of the line between periods.

[0004] On the other hand, protein DM-20 which are the active principle of the differentiation accelerator of this invention are equal to what lacked the amino acid residue of the 116-150th place of Above PLP, and mRNA imprinted from the gene (DNA) of PLP is the isoform built by the device of alternatives plicing. That is, it is the protein considered a part of 3rd exon of PLP to have received splicing, to have been the isoform which carried out deletion of the 35 amino acid, to have carried out localization to central nervous system myelin like PLP since the field of others including a film penetration domain was the same as that of PLP, and to have contributed

to stabilization of the layer system of myelin membrane. These are explained by for example, Mol.Neurobiol., 2, and 41-89 (1988) in full detail. However, the manifestation is widely accepted not only in an oligo Dendrobium site but in other neuroglia including astrocytic (\*\*\*\* gliocyte) one, and having a different function from PLP was guessed in the nervous system. [0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Like \*\*\*\*, myelinogenesis happens following differentiation of the neuroglia which takes and rolls a nerve cell and it, and growth, and sees a rapid formative period. That is, with the rat of GETSU gear teeth, and a mouse, it will be the formative period when six months of after the birth [ a viviparous anaphase to ] are rapid in 20 days and Homo sapiens from after-the-birth 10 every day. If invasion is added to a brain at the period before and behind this formative period, a lifting and possibility of leaving a sequela as a brain disorder will be enough considered in a myelinogenesis failure. That is, it will become the cause of the dyskinesia or a behavioral abnormality. Moreover, it is said that congenital lipidosis, phenylketonuria, cretinism, multiple sclerosis, etc. have high possibility of being a myelinogenesis failure. namely, a group to which a myelinogenesis failure is originally summarized like the above under the criteria of [ by science current in distinction, it is not easy according to / according to / at human encephalopathy / a myelinogenesis failure / demyelination, and ] the demyelinating disease although a demyelinating disease is distinguished -- it is a disease and multiple sclerosis, acute disseminated encephalomyelitis, etc. usually make a nucleus. Anyway, a myelinogenesis failure nature disease and a demyelinating disease are diseases which bring about a serious failure, and it is anxious for the cure.

[0006] When studying this disease, using a model animal with a myelinogenesis failure is known well. For example, the JIMPI (jimpy) mouse discovered by Phillips in 1954 takes a sex linkage recessive heredity format, and is widely known as an important model animal -- the failure is carrying out the \*\* office to the central nervous system. In this mouse, it has various mutation in a PLP gene, before a myelinogenesis term, while the oligo Dendrobium site has been immature, the abnormalities in differentiation are started, and carrying out denaturation omission is known. this invention person etc. has been examining quality of a main protein in myelinogenesis incompetence by using this model animal.

[0007] DM-20 showed the localization same as mentioned above as PLP, and were considered to be the protein which is participating in formation of the layer system of myelin membrane. However, since the oligo Dendrobium site of a jimpy mouse lived long when DM-20 being selectively produced in a fetus brain and a jimpy mouse were cultivated by that mRNA of DM-20 is produced transient at the fetus term before myelinogenesis, and the astrocytic culture supernatant of a normal mouse, operations other than formation of the layer system of the myelin membrane which DM-20 have were studied by this invention person etc. That is, a PLP gene is discovered also into cells other than OROGO Dendrobium sites, such as astrocytic one, at the time of the cell differentiation of a gloea, and functioning on survival maintenance or acceleration of differentiation of an OROGO Dendrobium site is studied. These experiment data are J.Neurochem 58, 2248-2253 (1992), and 33rd Japanese Society for Neurochemistry by this invention person etc. (1990) 34th Japanese Society for Neurochemistry (1991) It is announced by Glia 253-259 etc. (1988).

[0008] As a result of this invention person's etc. inquiring further wholeheartedly based on these data, it found out that DM-20 had a differentiation acceleration operation of an oligo Dendrobium site. This invention was made based on this knowledge, this invention promotes differentiation of an oligo Dendrobium site, and it aims at providing the therapy of a

myelinogenesis failure nature disease, a demyelinating disease, etc. with useful drugs.

[0009]

[Means for Solving the Problem] This invention made in order to solve the above-mentioned technical problem consists of containing protein DM-20 which are a kind of the gene product of a PLP gene, and is the differentiation accelerator of the oligo Dendrobium site which is a kind of a neuroglia. namely, a nervous system with mRNA(s) of DM-20 abundant [ this invention person etc. ] -- it was the cultured cell of the origin, and it studied that mRNA of DM-20 was strongly discovered into G26 cell which is especially an established cell line of a mouse oligo Dendrobium GURIOMA system, and the operation over the first brain cell culture system of the culture supernatant of this G26 cell was considered. Consequently, it became clear that the culture supernatant which is not refined [ of G26 cell ] has the effectiveness which promotes differentiation of an oligo Dendrobium site remarkably in the first brain cell culture system.

[0010] Next, similarly the culture supernatant of G26 cell was condensed about 5 times, and the dosage functionality of a differentiation acceleration operation of an oligo Dendrobium site was further examined using the sample which dialyzed. Moreover, when the same processing as the culture supernatant of G26 cell was performed also about the culture supernatant of a normal cell NIH-3T3 cell and comparison examination was simultaneously carried out as contrast at this time, it became clear that the culture supernatant of G26 cell which performed concentration and dialysis promotes differentiation of an oligo Dendrobium site on a dosage dependence target. However, the differentiation acceleration operation was not seen by the sample obtained from the culture supernatant of the normal NIH-3T3 cell by which DM-20 are not produced. It became clear that similarly the humoral factor which promotes differentiation of an OROGO Dendrobium site is emitted also to the culture supernatant of the mouse melanoma B16 which is producing many DM-20, and rat neuroblastoma B104 cell.

[0011] Furthermore, this invention person etc. studied whether this operation would relate to gene expression directly, and found out the operation which promotes differentiation of an oligo Dendrobium site remarkably to the culture supernatant of the transformed cell of the normal NIH-3T3 cell which introduced cDNA of DM-20. Thus, DM-20 became clear [ having a differentiation acceleration operation of the oligo Dendrobium site which is a central nervous system cell ].

[0012] It is the well-known matter as mentioned above, and DM-20 used by this invention can be obtained by the approach of a publication in the aforementioned reference etc., for example, they can cultivate DM-20 production cells, such as the oligo Dendrobium GURIOMA system established cell line G26, and can obtain them from the culture supernatant. Moreover, it can refine by giving the protein purification method of common use, such as dialysis, gel filtration, an ion exchange chromatography, an affinity chromatography, and electrophoresis. In addition, in this invention, as long as it has a differentiation acceleration operation of an oligo Dendrobium site, that to which deletion, the permuted thing, or other amino acid were added shall also be included for the amino acid sequence of the C terminal and/or an amino terminal by DM-20. This invention is useful as a differentiation accelerator of a central-nerves cell, and as mentioned above, by making the undifferentiated cell like a myelinogenesis failure specialize in human encephalopathy, when treating intrinsically various diseases (a myelinogenesis failure nature disease, demyelinating disease, etc.), it is useful.

[0013] Although the accelerator of this invention can take various formulation (for example, liquids and solutions, a solid preparation, a capsule, etc.), let it be injections with the support of them and common use of only DM-20 which are generally an active principle. The injections

concerned can be prepared with a conventional method, for example, DM-20 can be filtered with a filter etc., after dissolving in suitable solvents (for example, sterilized water, the buffer solution, a physiological saline, etc.), and it can be sterilized, and they can be prepared by filling up a sterile container subsequently. The active principle content in injections is adjusted suitably. On the occasion of pharmaceutical-preparation-izing, a stabilizing agent is added preferably and albumin, a globulin, gelatin, a mannitol, a glucose, a dextran, ethylene glycol, etc. are mentioned as a stabilizing agent, for example. Furthermore, an additive required for pharmaceutical-preparation-izing, for example, an excipient, the solubilizing agent, the antioxidant, the aponia-ized agent, the isotonicizing agent, etc. may be included. When it considers as liquid preparations, it is desirable for cryopreservation or freeze drying to remove moisture and to save. Lyophilized products -- business -- it is used for it, sometimes adding distilled water for injection etc. and sometimes remelting. The accelerator of this invention may be prescribed for the patient according to the suitable route of administration according to the gestalt of this pharmaceutical preparation. For example, it can be made the gestalt of injections and a vein, an artery, hypodermically, intramuscular, etc. can be medicated. The dose is suitably adjusted by a patient's symptom, age, weight, etc.

[0014]

[Effect of the Invention] The differentiation accelerator of this invention contains DM-20 which are a kind of the gene product of PLP, and DM-20 promote remarkably differentiation of the oligo Dendrobium site which is a neuroglia. Therefore, since the differentiation accelerator of this invention can promote myelinogenesis by making an undifferentiated neuroglia specialize to the myelinogenesis failure in Homo sapiens encephalopathy, when treating intrinsically various diseases (namely, a myelinogenesis failure nature disease, a demyelinating disease, etc.), it is useful.

[0015]

[Example] Hereafter, although this invention is explained to a detail based on an example, this invention is not limited to an example.

After making all RNA of 0.2microg extracted from these cultured cells react to PLP and the DM-20 gene-expression list in example 1 various cultured cells with reverse transcriptase using G26 and the normal cell NIH-3T3 cell which are the acquisition various cultured cells of cell culture supernatant liquid, i.e., an oligo Dendrobium GURIOMA system established cell line, PCR was performed 45 times using Tag polymerase. Next, hybridization was carried out using the oligonucleotide probe which carried out the label by <sup>32</sup>P, and autoradiography was performed. On the other hand, the check of PLP in various cultured cells and DM-20 gene expression was performed, using as control the band amplified from the PLP gene and DM-20 clone.

[0016] In addition, about the above-mentioned approach, it is based on the well-known approach and an experimental-medicine separate volume "a neurobiochemistry manual" has a publication in detail about cultivation, for example (experimental-medicine separate volume p106-128.1992). The result is shown in drawing 1. As shown in drawing 1, in G26 cell which is an oligo Dendrobium GURIOMA system established cell line, the gene of DM-20 is discovered remarkably and, on the other hand, PLP and the manifestation of DM-20 are not at the NIH-3T3 cell which is a normal cell. In addition, the band amplified from PLP (\*\*) and DM-20 (\*\*) clone to drawing 1 was shown in the line of cDNA. Next, G26 cell and the NIH-3T3 cell were cultivated for two days by N4 culture medium based on Bottenstein's and others approach (J.Neurosci.Res.20, 291-303, 1988), and each cell supernatant liquid was obtained based on the approach of common use.

[0017] The first brain cell was cultivated by the well-known approach, i.e., the protocol currently explained by the experimental-medicine separate volume "neurobiochemistry manual p129-135 and 1992" in full detail, from the brain on viviparous the 17th of an example 2 founder brain cell culture ICR system mouse. In a detail, more the brain of the ICR system mouse on fetus the 17th from ejection and the cerebral cortex On the cover glass which was made to distribute a cell by trypsinization and carried out polyethyleneimine processing, After cultivating for three days by DMEM:Ham's F 12= 1:1 which starts culture by the cell density of  $3 \times 10^5$ , and contains fetal calf serum 10%, It cultivated for four more days by Bottenstein's and others Defined medium (J.Neurosci.Res.20, 291-303, 1988), N 4:03= 1:2, or conditioned medium:03=1:2.

[0018] In the first brain cell obtained in the example 2 of the effectiveness above of G26 cell-culture supernatant liquid in an example 3 founder brain cell, the immunity staining technique of an oligo Dendrobium site was tried. That is, after carrying out the raw-silk-dyeing color of the dyeing of an oligo Dendrobium site, using an FITC anti-mouse antibody as a second antibody, using a mouse anti-galactocerebroside (GalC) monoclonal antibody (01 antibodies) as a primary antibody, it is possible by fixing by the paraformaldehyde and counting an electropositive cell under a fluorescence microscope. In addition, the above-mentioned staining technique can be easily checked, if a well-known technique is used. When cultivating in the example 2, G26 cell-culture supernatant liquid obtained in the example 1 was added to culture medium, and immunity dyeing was performed by the same approach as the above. Consequently, it became clear that the culture supernatant which is not refined [ of G26 cell ] has the effectiveness which promotes differentiation of an oligo Dendrobium site remarkably in the first brain cell culture system.

[0019] Although the oligo Dendrobium site differentiation promoter and the examination cell culture of the dose-dependency of DM-20 which are included in example 4G 26 cell-culture supernatant liquid were performed like examples 2 and 3, instead of the cell culture supernatant liquid itself obtained in the example 1, the culture supernatant of G26 cell or a NIH-3T3 cell was condensed about 5 times, and the dose-dependency was analyzed using the sample dialyzed further. That is, two culture was performed after immunity dyeing indicated in the example 3 about each concentration indicated to be also G26 cell and a NIH-3T3 cell by drawing 2, 5 visual-field [ every ] (200x) positivity cell was counted, respectively, and the average was calculated. The result was shown in drawing 2. In drawing 2, - shows concentration / dialysis sample of G26 cell-culture supernatant liquid, and O shows concentration / dialysis sample (control) of a NIH-3T3 cell culture supernatant. As shown in drawing 2, it became clear that G26 cell-culture supernatant liquid promotes differentiation of an oligo Dendrobium site on a dosage dependence target. However, there was such no effectiveness at the NIH-3T3 cell supernatant liquid by which DM-20 are not produced.

[0020] The protein translation field of PLP and the clone of DM-20 obtained from the library of production of the transformed cell using an example 5\*\* retrovirus vector and cDNA of the preparation mouse cerebellum of a culture supernatant was inserted in the pDL+ retrovirus vector. At this time, PLP or DM-20 were imprinted from LTR, and they were produced so that a neo resistance gene might be discovered as a marker. Moreover, the field of psi+ was inserted in order to gather the efficiency of infection (refer to drawing 3). Subsequently, this plasmid was introduced to the virus package cell psi 2 by the calcium phosphate method of common use, respectively, the pDL+</SUP>PLP virus and pDL+DM-20 virus which were obtained were infected with the NIH-3T3 cell, respectively, and the transformed cell was produced (refer to drawing 4). The transformed cell which has discovered PLP or DM-20cDNA was cultivated for 1 or two days by N4 well-known synthetic medium (J.Neurosci.Res., 20, 291-303, 1988), and

culture supernatants were collected. After carrying out the ultrafiltration of this culture supernatant to 1/10 capacity with the Amicon (YM-10) concentration machine, it was dialyzed in 5mM phosphate buffer solution, 50mM NaCl, and 1microg/ml PMSF, and was made into the concentration sample.

[0021] \*\* The effectiveness over the primary culture cell of the fetus mouse prepared in the example 2 was investigated using the concentration sample obtained by the effectiveness above-mentioned \*\* of the culture supernatant in the first brain cell. In a detail, more the brain of the IRC mouse on fetus the 17th from ejection and the cerebral cortex On the cover glass which was made to distribute a cell by trypsinization and carried out polyethyleneimine processing, Culture was started by the cell density of  $3 \times 10^5$ , and after cultivating for three days by DMEM:Ham's F 12= 1:1 which contains fetal calf serum 10%, it cultivated for four more days by the serum free medium mixed by N4:O3=1:2 containing the concentration sample obtained by the above-mentioned \*\*. Dyeing of an oligo Dendrobium site was performed like the example 3, and counted the number of electropositive cells under the fluorescent microscope. The result is shown in drawing 5. In this drawing, \*\* shows the culture supernatant (control) of a normal NIH-3T3 cell for the culture supernatant of the transformed cell into which - introduced PLPcDNA for the culture supernatant of the transformed cell into which \*\* introduced DM-20cDNA. As shown in drawing 5, the culture supernatant of the transformed cell which introduced DM-20cDNA or PLPcDNA showed notably the increment in the number of GalC positivity cells which is the marker of an oligo Dendrobium site.

---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the result of the autoradiography in an example 1.

[Drawing 2] It is drawing showing the relation of the protein concentration and the number of electropositive cells in an example 4. In drawing 2, - shows concentration / dialysis sample of G26 cell-culture supernatant liquid, and O shows concentration / dialysis sample (control) of a NIH-3T3 cell culture supernatant.

[Drawing 3] It is drawing showing the outline of the structure of the pDL+ retrovirus vector which introduced DM-20cDNA or PLPcDNA.

[Drawing 4] It is drawing showing the outline of the method of preparation of the transformed cell which introduced DM-20cDNA or PLPcDNA.

[Drawing 5] It is drawing showing the relation of the protein concentration and the number of electropositive cells in an example 5. In drawing 5, \*\* shows the culture supernatant (control) of a normal NIH-3T3 cell for the culture supernatant of the transformed cell into which - introduced PLPcDNA for the culture supernatant of the transformed cell into which \*\* introduced DM-20cDNA.

---

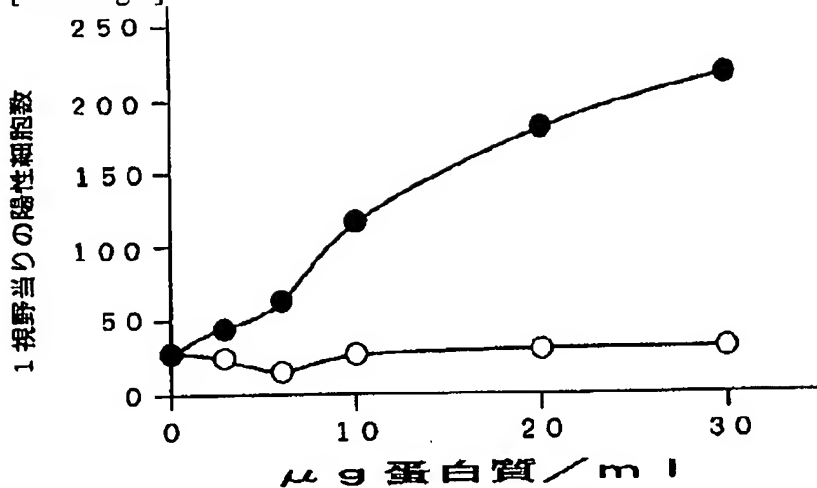
## DRAWINGS

---

[Drawing 1]


  
 cDNA
   
 G26
   
 NIH-3T3

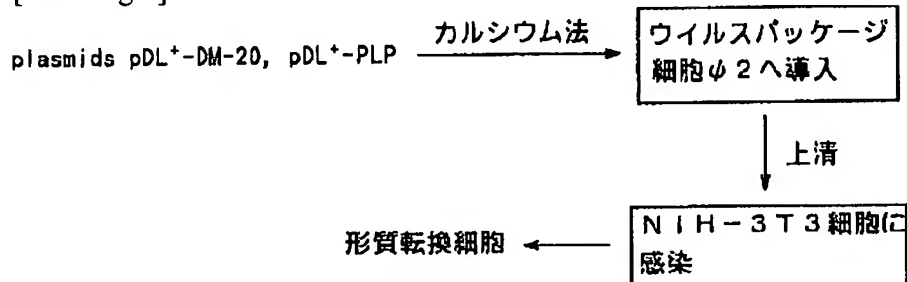
[Drawing 2]



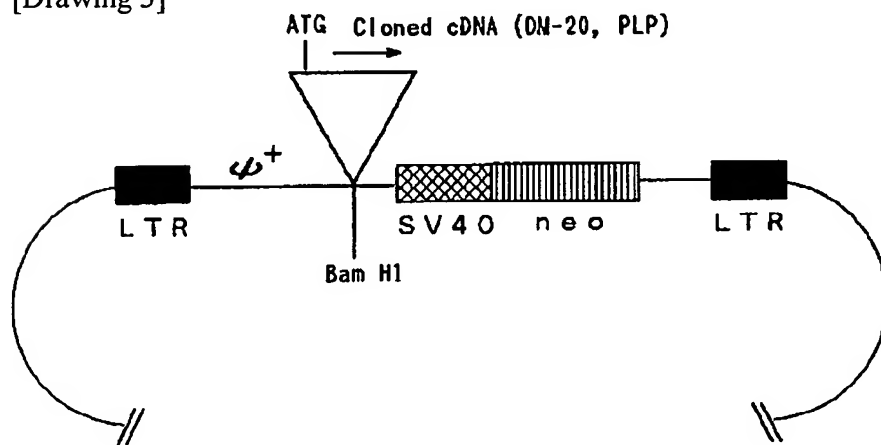
● : G26 細胞培養上清の濃縮・透析試料

○ : NIH-3T3 細胞培養上清の濃縮・透析試料

[Drawing 4]

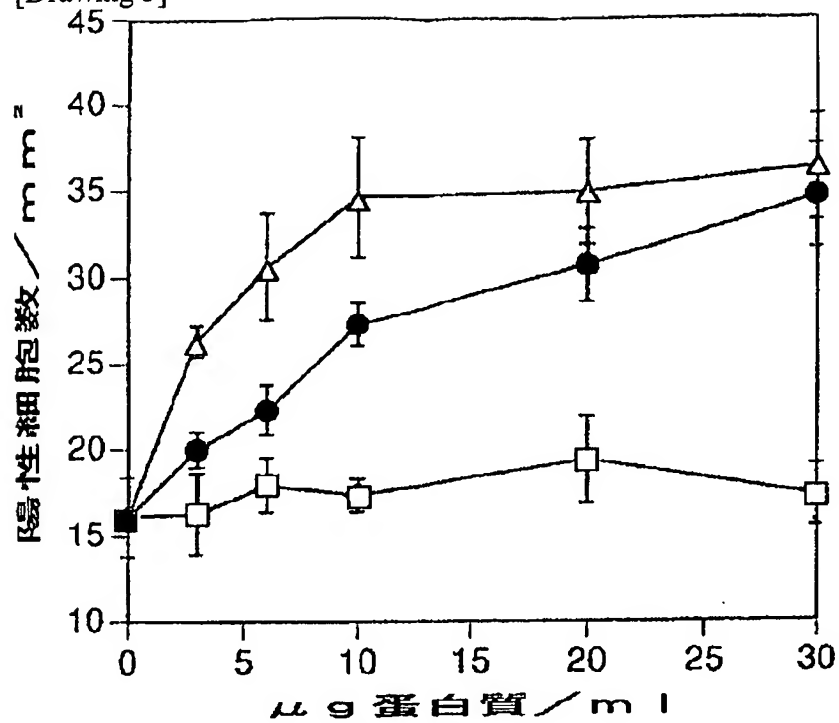


[Drawing 3]





[Drawing 5]



- $\Delta$  : DM-20cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清  
 $\bullet$  : PLPcDNAを導入した形質転換細胞の培養上清  
 $\square$  : 正常なNIH-3T3細胞の培養上清

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-211683

(43)公開日 平成6年(1994)8月2日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02	A A B	8314-4 C		
	A D S			
// C 1 2 P 21/00		A 8214-4 B		
(C 1 2 P 21/00				
C 1 2 R 1:91)				
審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 6 頁)				

(21)出願番号 特願平5-246315

(22)出願日 平成5年(1993)9月6日

(31)優先権主張番号 特願平4-263031

(32)優先日 平4(1992)9月4日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 392017978

御子柴 克彦

東京都三鷹市井の頭2-19-25

(72)発明者 御子柴 克彦

東京都三鷹市井の頭2-19-25

(72)発明者 池中 一裕

大阪府堺市北条町2-418-1

(74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 分化促進剤

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 オリゴデンドロサイト (希突起膠細胞) の分化促進作用を有する蛋白質DM-20を含有する分化促進剤を提供する。

【構成】 この分化促進剤は、ミエリンプロテオリピド蛋白質 (myelin proteolipid protein) 遺伝子の遺伝子産物である蛋白質DM-20を有効成分とする。蛋白質DM-20はオリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する作用を有する。従って、ヒトの脳疾患において、ミエリン形成障害の如き未分化の細胞を分化させることにより、種々の疾患 (ミエリン形成障害性疾患、脱髄性疾患など) を本質的に治療する上で有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミエリンプロテオリピド蛋白質 (myelin proteolipid protein) 遺伝子の遺伝子産物である蛋白質DM-20を含有するオリゴデンドロサイトの分化促進剤。

【請求項2】 ミエリン形成障害性疾患治療剤又は脱髄性疾患治療剤である請求項1記載の分化促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はオリゴデンドロサイト (希突起膠細胞) の分化促進剤に関する。より詳細には、ミエリンプロテオリピド蛋白質 (myelin proteolipid protein、以下、PLPという) 遺伝子の遺伝子産物である蛋白質DM-20を有効成分とし、ミエリン形成障害性疾患、脱髄性疾患等の治療に有用な分化促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 ミエリンは、神経細胞の突起である軸索 axon のまわりを巻いて包んでいる膜であり、中枢神経系では希突起膠細胞 (oligodendrocyte)、末梢神経系では、シュワン細胞 (schwann cell) の突起が分化した膜から形成されている。神経系内での存在部位は、主として中枢神経系では白質であり、末梢神経系では、有髄線維であることが知られている。一般的に、その役割として、神経細胞の突起を被覆することにより、細胞相互間の電気的な神経伝導のものを防ぐと同時に、軸索の露出部であるランビエ紋輪を興奮させて刺激の伝導をする跳躍伝導の役割がよく知られている。また、上記ミエリンが軸索のまわりをとり巻いていく過程をミエリン形成過程といい、動物の種により形成速度の早い時期が異なり、ヒトにおいては、周産期に最もはやくなり、2歳の終わり頃までには、ミエリン形成の大部分は終了する。

【0003】 中枢神経系ミエリンの主要な構成蛋白質として知られているものに、ミエリン塩基性蛋白質 (myelin basic protein: MBP) とミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) があり、ミエリン形成期に同調して、発現が盛んになる。MBPは内膜間に局在し、細胞膜の内側どうしを接着させていると考えられている。また、PLPはそのアミノ酸組成の疎水性から膜を貫通し、さらに一部が隣接した脂質二重膜に入り込み、外膜どうしを接着させ、周期間線の形成をはじめとしたミエリン膜の安定化に関与していると考えられている。

【0004】 一方、本発明の分化促進剤の有効成分である蛋白質DM-20は、上記PLPの116~150位のアミノ酸残基が欠落したものに等しく、PLPの遺伝子 (DNA) から転写されたmRNAが選択的スプライシングという機構により、つくられるアイソフォームである。即ち、PLPの第3エクソンの一部がスプライシングを受け、35個のアミノ酸を欠失したアイソフォームであり、膜貫通ドメインを含むその他の領域はPLP

2

と同一であるため、PLPと同様に中枢神経系ミエリンに局在し、ミエリン膜の層構造の安定化に寄与していると考えられてきた蛋白質である。これらは、例えば、Mol. Neurobiol., 2, 41-89, (1988)に詳述されている。しかし、その発現は、オリゴデンドロサイトのみではなく、アストロサイト (星条膠細胞) をはじめとする他のグリア細胞にも広く認められており、神経系において、PLPと異なる機能を有することが推察されていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上述の如く、ミエリン形成は神経細胞やそれをとり巻く神経膠細胞の分化、成長につづいて起こり、急激な形成期を迎える。即ち、ゲッ齒類のラット、マウスでは、生後10日頃から20日、ヒトでは、胎生後期から生後6ヶ月が急激な形成期である。かかる形成期前後の期間に脳に侵襲が加えられると、ミエリン形成障害を起こし、脳障害として後遺症を残す可能性が十分考えられる。即ち、運動障害や行動異常の原因となるであろう。また、先天性脂質代謝異常症、フェニルケトン尿症、クレチン病、多発性硬化症等は、ミエリン形成障害である可能性が高いといわれている。即ち、本来、ミエリン形成障害は脱髄性疾患とは区別されるものだが、上記の如くヒトの脳疾患では、ミエリン形成障害によるのか、脱髄によるのか、判別は現在の科学では容易ではなく、脱髄疾患という範疇でまとめられる一群の疾患であり、通常、多発性硬化症や急性散在性脳脊髄炎等が中核をなす。いずれにせよ、ミエリン形成障害性疾患及び脱髄性疾患は重度の障害をもたらす疾患であり、その治療法が切望されている。

【0006】 かかる疾患を研究する場合、ミエリン形成障害のあるモデル動物を用いることがよく知られている。例えば、1954年Phillipsによって発見されたジンビー (jumpy) マウスは、伴性劣性の遺伝様式をとり、中枢神経系に障害が限局しているなど重要なモデル動物として広く知られている。このマウスにおいては、PLP遺伝子に種々の突然変異を持ち、ミエリン形成期以前にオリゴデンドロサイトが幼弱なまま分化異常を起し、変性脱落してしまうことが知られている。本発明者等は、このモデル動物を用いることにより、ミエリン形成不全における主要蛋白質の検討を行ってきた。

【0007】 DM-20は、前述のようにPLPと同じ局在を示し、ミエリン膜の層構造の形成に関与している蛋白質と考えられていた。しかし、胎生期脳内にDM-20が選択的に生産されていることや、ジンビーマウスは、ミエリン形成以前の胎仔期においてDM-20のmRNAが一過性に産生されること、及び正常なマウスのアストロサイトの培養上清で培養するとジンビーマウスのオリゴデンドロサイトが延命することから、DM-20の有するミエリン膜の層構造の形成以外の作用が本発明者等により研究されていた。即ち、グリアの細胞分化時にPLP遺伝子がアストロサイト等、オリゴデンドロ

3

サイト以外の細胞にも発現し、オリゴデンドロサイトの生存維持又は分化促進に機能していることが研究されている。これらの実験事実、本発明者等により、J. Neurochem 58, 2248-2253 (1992)、第33回日本神経化学会 (1990)、第34回日本神経化学会 (1991)、Glia 253-259 (1988)などに発表されている。

【0008】これらの事実に基づき、本発明者等は、さらに鋭意研究を行った結果、DM-20がオリゴデンドロサイトの分化促進作用を有することを見出した。本発明はかかる知見に基づいてなされたもので、本発明はオリゴデンドロサイトの分化を促進し、ミエリン形成障害性疾患、脱髄性疾患などの治療に有用な薬剤を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するためになされた本発明は、PLP遺伝子の遺伝子産物の一種である蛋白質DM-20を含有することからなり、グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトの分化促進剤である。即ち、本発明者等は、DM-20のmRNAが豊富な神経系由来の培養細胞で、とりわけマウスオリゴデンドログリオーマ系の株化細胞であるG26細胞にDM-20のmRNAが強く発現していることを研究し、このG26細胞の培養上清の初代脳細胞培養系に対する作用を検討した。その結果、G26細胞の未精製の培養上清は、初代脳細胞培養系においてオリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する効果を持つことが明らかになった。

【0010】次に、同じくG26細胞の培養上清を約5倍に濃縮し、さらに、透析をした試料を用いて、オリゴデンドロサイトの分化促進作用の用量相関性を検討した。また、この際、同時に、対照として正常細胞NIH-3T3細胞の培養上清に関してもG26細胞の培養上清と同様の処理を行い、比較検討したところ、濃縮及び透析を行ったG26細胞の培養上清は、用量依存的にオリゴデンドロサイトの分化を促進することが明らかになった。しかし、DM-20が産生されていない、正常なNIH-3T3細胞の培養上清から得られた試料には、分化促進作用はみられなかった。同様に、多くのDM-20を産生しているマウスメラノーマB16、ラットニューロブラストーマB104細胞の培養上清にもオリゴデンドロサイトの分化を促進する液性因子が放出されていることが明らかになった。

【0011】更に、本発明者等は、この作用が遺伝子発現に直接関連したものであるか否かの研究を行い、DM-20のcDNAを導入した正常なNIH-3T3細胞の形質転換細胞の培養上清にオリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する作用を見出した。このように、DM-20は、中枢神経系細胞であるオリゴデンドロサイトの分化促進作用を有することが明らかとなった。

【0012】本発明で用いられるDM-20は前述のよ

4

うに公知物質であり、前記の文献等に記載の方法で得ることができ、例えば、オリゴデンドログリオーマ系株化細胞G26などのDM-20産生細胞を培養し、その培養上清から得ることができる。また、透析、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、電気泳動などの慣用の蛋白質精製法に付すことにより精製することができる。なお、本発明において、DM-20には、オリゴデンドロサイトの分化促進作用を有する限り、そのC末端及び／又はN末端のアミノ酸配列が、欠失若しくは置換されたもの又は他のアミノ酸が付加されたものも包含されるものとする。本発明は、中枢神経細胞の分化促進剤として有用であり、前述のように、ヒトの脳疾患において、ミエリン形成障害の如き未分化の細胞を分化させることにより、種々の疾患（ミエリン形成障害性疾患、脱髄性疾患など）を本質的に治療する上で有用である。

【0013】本発明の促進剤は種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤など）をとりうるが、一般的には有効成分であるDM-20のみ又はそれらと慣用の担体と共に注射剤とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、DM-20を適切な溶剤（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中の有効成分含量は、適宜調整される。製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等強化剤等を含んでもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。本発明の促進剤は、該製剤の形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、体重などにより適宜調整される。

【0014】

【発明の効果】本発明の分化促進剤は、PLPの遺伝子産物の一種であるDM-20を含有しており、DM-20はグリア細胞であるオリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する。従って、本発明の分化促進剤は、ヒト脳疾患におけるミエリン形成障害に対して、未分化のグリア細胞を分化させることによりミエリン形成を促進することができるので、種々の疾患（即ち、ミエリン形成障害性疾患、脱髄性疾患など）を本質的に治療する上で有用である。

【0015】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明

するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

##### 各種培養細胞におけるPLP及びDM-20遺伝子の発現並びに細胞培養上清の取得

各種培養細胞、即ち、オリゴデンドログリオーマ系株化細胞であるG26及び正常細胞NIH-3T3細胞を用いて、それら培養細胞から抽出した0.2µgの全RNAを逆転写酵素と反応させた後、Tagポリメラーゼを用いて45回PCRを行った。次に、<sup>32</sup>Pでラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ハイブリダイゼーションさせ、オートラジオグラフィーを行った。一方、PLP遺伝子及びDM-20クローンから増幅したバンドをコントロールとして用いて、各種培養細胞でのPLP及びDM-20遺伝子の発現の確認を行った。

【0016】なお、上記方法については、公知の方法に準拠しており、培養法に関しては、例えば、実験医学別冊「神経生化学マニュアル」に詳しく記載がある(実験医学別冊p106-128, 1992)。その結果を図1に示す。図1に示されるように、オリゴデンドログリオーマ系株化細胞であるG26細胞においては、著しくDM-20の遺伝子が発現されており、一方、正常な細胞であるNIH-3T3細胞ではPLP及びDM-20の発現は全くない。なお、図1に、PLP(□)及びDM-20(△)クローンから増幅したバンドをcDNAのラインに示した。次に、G26細胞及びNIH-3T3細胞をBottensteinらの方法(J. Neurosci. Res. 20, 291-303, 1988)に準拠して、N4培地で2日間培養し、慣用の方法に準拠して各々の細胞上清が得られた。

#### 【0017】実施例2

##### 初代脳細胞培養

ICR系マウスの胎生17日の脳から公知の方法、即ち、実験医学別冊「神経生化学マニュアルp129-135, 1992年」に詳述されているプロトコルで初代脳細胞の培養を行った。より詳細には、胎生期17日のICR系マウスの脳を取り出し、大脳皮質から、トリブシン処理により細胞を分散させ、ポリエチレンイミン処理したカバーガラス上、3×10<sup>5</sup>の細胞密度で培養を開始し、10%牛胎児血清を含むDMEM:Ham's F12=1:1で3日間培養した後、BottensteinらのDefined medium(J. Neurosci. Res. 20, 291-303, 1988)、N4:03=1:2又はconditioned medium:03=1:2で更に4日間培養した。

#### 【0018】実施例3

##### 初代脳細胞におけるG26細胞培養上清の効果

上記の実施例2で得られた初代脳細胞において、オリゴデンドロサイトの免疫染色法を試みた。即ち、オリゴデンドロサイトの染色は、一次抗体としてマウス抗ガラクトセレブロシド(GalC)モノクローナル抗体(01抗体)を用いて、二次抗体としてFITC抗マウス抗体を用いて生染色した後、パラホルムアルデヒドで固定

し、蛍光顕微鏡下で陽性細胞を数えることで可能である。なお、上記染色法は公知の技術を用いれば容易に確認できる。実施例2で、培養する際に、培養液に実施例1で得られたG26細胞培養上清を加えて上記と同様の方法で免疫染色を行った。その結果、G26細胞の未精製の培養上清は初代脳細胞培養系においてオリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する効果を持つことが明らかになった。

#### 【0019】実施例4

##### G26細胞培養上清中に含まれるオリゴデンドロサイト分化促進因子、DM-20の用量依存性の検討

細胞培養は実施例2及び3と同様に行ったが、実施例1で得られた細胞培養上清そのものの代りに、G26細胞又はNIH-3T3細胞の培養上清を約5倍に濃縮し、更に透析した試料を用いてその用量依存性を解析した。即ち、実施例3で記載した免疫染色後、G26細胞及びNIH-3T3細胞とも図2で示す各濃度について2回の培養を行い、それぞれ5視野(200×)ずつ陽性細胞を数え、その平均値を計算した。その結果を図2に示した。図2において、●はG26細胞培養上清の濃縮・透析試料を、○はNIH-3T3細胞培養上清の濃縮・透析試料(コントロール)を示す。図2に示されるように、G26細胞培養上清は用量依存的にオリゴデンドロサイトの分化を促進することが明らかになった。しかし、DM-20が産生されていないNIH-3T3細胞上清ではこのような効果はなかった。

#### 【0020】実施例5

##### ①レトロウイルスベクターを用いた形質転換細胞の作製及び培養上清の調製

マウス小脳のcDNAのライブラリーから得たPLPとDM-20のクローンの蛋白質翻訳領域を、pDL<sup>+</sup>レトロウイルスベクターに挿入した。このとき、PLP又はDM-20はLTRから転写され、マーカーとしてneo耐性遺伝子を発現するように作製した。また、感染効率を上げるためψ<sup>+</sup>の領域を挿入した(図3参照)。次いで、このプラスミドを、慣用のリン酸カルシウム法により、それぞれウイルスパッケージ細胞ψ2へ導入し、得られたpDL<sup>+</sup>PLPウイルス及びpDL<sup>+</sup>DM-20ウイルスを、それぞれNIH-3T3細胞に感染させて形質転換細胞を作製した(図4参照)。PLP又はDM-20cDNAを発現している形質転換細胞を、公知のN4合成培地(J. Neurosci. Res., 20, 291-303, 1988)で、1又は2日間培養し、培養上清を回収した。この培養上清を、アミコン(YM-10)濃縮機で10分の1容量に限り濃縮した後、5mMリン酸緩衝液、50mM NaCl、1µg/ml PMSFにて透析し濃縮試料とした。

#### 【0021】②初代脳細胞における培養上清の効果

上記①で得られた濃縮試料を用いて、実施例2で調製される胎仔マウスの初代培養細胞に対する効果を調べた。

7

より詳細には、胎生期17日のIRCマウスの脳を取り出し、大脳皮質から、トリプシン処理により細胞を分散させ、ポリエチレンイミン処理したカバーガラス上、 $3 \times 10^5$ の細胞密度で培養を開始し、10%牛胎児血清を含むDMEM:Ham's F12=1:1で3日間培養した後、上記①で得られた濃縮試料を含むN4:O3=1:2で混合した無血清培地で更に4日間培養した。オリゴデンドロサイトの染色は、実施例3と同様にして行い、蛍光顕微鏡下で陽性細胞数を数えた。その結果を図5に示す。同図において、△はDM-20 cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清を、●はPLP cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清を、□は正常なNIH-3T3細胞の培養上清（コントロール）を示す。図5に示されるように、DM-20 cDNA又はPLP cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清は、オリゴデンドロサイトのマーカーであるGalC陽性細胞数の増加を顕著に示した。

【図面の簡単な説明】

【図1】



8

【図1】実施例1におけるオートラジオグラフィーの結果を示す図である。

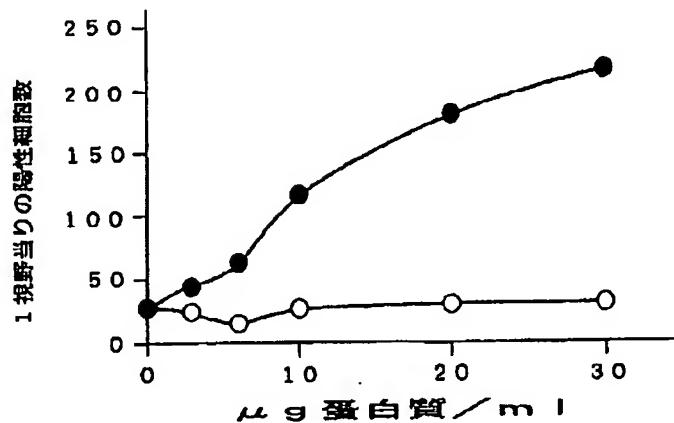
【図2】実施例4における蛋白質濃度と陽性細胞数との関係を示す図である。図2において、●はG26細胞培養上清の濃縮・透析試料を、○はNIH-3T3細胞培養上清の濃縮・透析試料（コントロール）を示す。

【図3】DM-20 cDNA又はPLP cDNAを導入したpDL+レトロウイルスベクターの構造の概要を示す図である。

【図4】DM-20 cDNA又はPLP cDNAを導入した形質転換細胞の調製法の概要を示す図である。

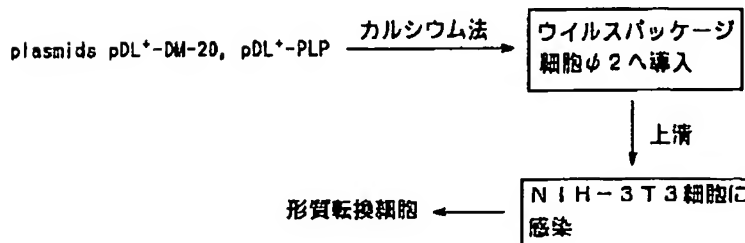
【図5】実施例5における蛋白質濃度と陽性細胞数との関係を示す図である。図5において、△はDM-20 cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清を、●はPLP cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清を、□は正常なNIH-3T3細胞の培養上清（コントロール）を示す。

【図2】

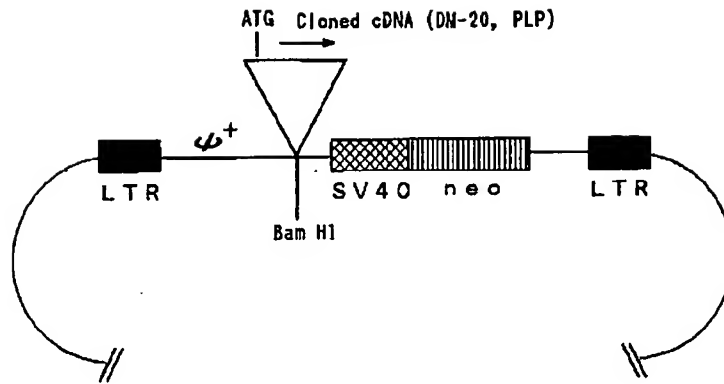


● : G26細胞培養上清の濃縮・透析試料  
○ : NIH-3T3細胞培養上清の濃縮・透析試料

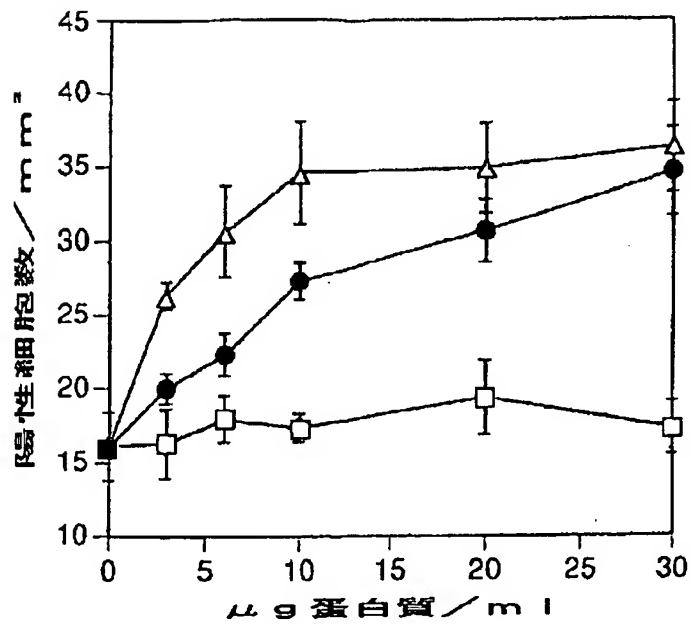
【図4】



【図3】



【図5】



△ : DM-20 cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清  
 ● : PLP cDNAを導入した形質転換細胞の培養上清  
 □ : 正常なNIH-3T3細胞の培養上清